

Efeito renoprotetor dos flavonoides do vinho na nefrotoxicidade do imunossupressor Tacrolimus*

Renoprotective effects of wine flavonoids in nephrotoxicity of the immunosuppressant Tacrolimus

Efecto renoprotector de los flavonoides del vino en la nefrotoxicidad del inmunosupresor Tacrolimus

Wanessa Teixeira Silva¹, Juliana Guareschi dos Santos², Miriam Watanabe³,
Maria de Fátima Fernandes Vattimo⁴

RESUMO

Objetivo: Verificar o efeito renoprotetor do extrato de *Vitis vinifera* L na nefrotoxicidade induzida pelo Tacrolimus em estudos experimentais com ratos. **Métodos:** Pesquisa quantitativa com modelo experimental, na qual foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 250g – 300g, tratados uma vez ao dia por cinco dias, por gavagem, conforme segue: Salina (controle, cloreto de sódio 0,1ml); Vitis (*Vitis vinifera* L 3mg/kg), FK (0,5mg/kg) e FK+Vitis (0,5mg/kg + 3mg/kg, respectivamente). A função renal foi avaliada por meio do clearance de creatinina (Clcr/ 100g, método Jaffé) e a peroxidação lipídica pela mensuração de peróxidos urinários (PU, FOX-2). **Resultados:** A administração de FK elevou a excreção de peróxidos e reduziu o clearance de creatinina, e a administração simultânea com *Vitis vinifera* L protegeu a função renal nesses parâmetros. **Conclusão:** Os dados confirmaram a lesão nefrotóxica induzida pelo Tacrolimus e demonstraram o efeito renoprotetor do *Vitis Vinifera* L.

Descritores: Lesão renal aguda/induzido quimicamente; Imunossupressores/toxicidade; *Vitis vinifera* L; Ratos Wistar

ABSTRACT

Objective: To investigate the renoprotective effects of the extract of *Vitis vinifera* L in the Tacrolimus-induced nephrotoxicity in experimental studies with rats. **Methods:** Quantitative survey with an experimental model in which adult male, Wistar rats, weighing between 250g - 300g, were used. The rats were treated once a day for five days by gavage as follows: Saline (control, sodium chloride, 0.1 ml); Vitis (*Vitis vinifera* L 3mg/kg), FK (0.5 mg / kg); and, FK + Vitis (0.5 mg / kg + 3 mg / kg, respectively). Renal function was assessed by creatinine clearance (CrCL / 100g, Jaffe method) and lipid peroxidation by measurement of urinary peroxides (PU, FOX-2). **Results:** The administration of FK increased the excretion of peroxides and reduced creatinine clearance, and simultaneous administration with *Vitis vinifera* L protected the renal function in these parameters. **Conclusion:** These data confirm the injury induced by nephrotoxic Tacrolimus and demonstrated the renoprotective effect of *Vitis vinifera* L.

Keywords: Acute kidney injury/chemically induced; Immunosuppressive agents/toxicity; *Vitis vinifera* L ; Rats, Wistar

RESUMEN

Objetivo: Verificar el efecto renoprotector del extracto de *Vitis vinifera* L en la nefrotoxicidad inducida por el Tacrolimus en estudios experimentales con ratas. **Métodos:** Investigación cuantitativa con modelo experimental, en la cual fueron utilizadas ratas Wistar, machos, adultos, que pesaban entre 250g – 300g, tratados una vez al día por cinco días, por alimentación forzada, conforme sigue: Salina (control, cloreto de sodio 0,1ml); Vitis (*Vitis vinifera* L 3mg/kg), FK (0,5mg/kg) e FK+Vitis (0,5mg/kg + 3mg/kg, respectivamente). La función renal fue evaluada por medio del clearance de creatinina (Clcr/ 100g, método Jaffé) y la peroxidación lipídica por la mensuración de peróxidos urinarios (PU, FOX-2). **Resultados:** La administración de FK elevó la excreción de peróxidos y redujo el clearance de creatinina, y la administración simultánea con *Vitis vinifera* L protegió la función renal en esos parámetros. **Conclusión:** Los datos confirmaron la lesión nefrotóxica inducida por el Tacrolimus y demostraron el efecto renoprotector del *Vitis Vinifera* L.

Descritores: Lesión renal aguda/inducido químicamente; Agentes inmunosupresores/toxicidad; *Vitis vinifera* L; Ratas Wistar

* Trabalho realizado na Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo - USP. São Paulo (SP), Brasil.

¹ Enfermeira da UBS/ESF Jardim Fanganiello. Pós-graduanda (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo - USP – São Paulo (SP), Brasil.

² Acadêmica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo - USP. São Paulo (SP), Brasil.

³ Pós-graduanda (Doutoranda) pelo do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo - USP. São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Livre-docente da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo - USP. São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o número de transplantes de órgãos cresceu significativamente, tanto que as metas propostas para 2009 ultrapassaram as expectativas. O objetivo era atingir 4.000 transplantes renais e 1.300 de fígado. Nesse ano, foram realizados 4.259 transplantes renais e 1.658 de fígado, tendo sido esses os melhores resultados já obtidos no País⁽¹⁾. Apesar desse fato, ainda é grande o número de pacientes na fila de espera. Apenas no Estado de São Paulo, são 12.260, desses 10.128 aguardam um transplante renal⁽²⁾.

O aumento do número de pacientes transplantados e a quantidade de pacientes na fila de espera têm elevado ainda mais o interesse por terapias imunossupressoras com melhores resultados e menores efeitos indesejáveis.

Os medicamentos imunossupressores com mais frequência utilizados no transplante renal são a Ciclosporina ou Tacrolimus (FK506); Azatioprina ou Micofenolato Mofetil e a prednisona⁽³⁾. Em razão da sua eficácia, o Tacrolimus foi, em 2003, o inibidor de calcineurina mais utilizado nos transplantes realizados nos Estados Unidos da América, sendo prescrito em 67% dos transplantes renais, 89% de fígado, 81% de rim/pâncreas, 77% de pâncreas, 65% de pulmão, 48% de coração/pulmão e 42% de coração⁽⁴⁾.

O Tacrolimus é um antibiótico macrolídico, seu efeito imunossupressor ocorre por meio da inibição da calcineurina, impedindo a ativação das células Th e a produção de IL-2⁽⁵⁾. O FK506 surgiu como uma alternativa para o uso da Ciclosporina A. Comparando-se os dois fármacos, o FK506 demonstrou menor taxa de rejeição aguda e crônica, melhor função renal a longo prazo pós-transplante e menores índices de hiperlipidemia e hipertensão⁽⁴⁾.

Os principais efeitos indesejáveis do Tacrolimus são: tremores, diarreia, constipação, dor de cabeça, dor abdominal, hipertensão, náuseas e decréscimo da função renal com aumento da creatinina, ou seja, a nefrotoxicidade. Desses, o último é o mais significativo, considerando que o transplante é uma alternativa à retomada da função da renal comprometida por causas clínicas diversas.

A nefrotoxicidade do FK 506 é uma das causas da lesão renal aguda, após o transplante renal. Os mecanismos fisiopatológicos desse efeito colateral ainda não foram totalmente compreendidos, porém parecem estar associados ao aumento da produção de radicais livres de oxigênio e consequente desequilíbrio redox, ou seja, desbalanço entre oxidantes e antioxidantes endógenos⁽⁶⁾. Esse mecanismo de lesão desencadeia uma série de eventos relacionados à nefrotoxicidade do FK506, entre eles, destacam-se defeitos isolados da função tubular, infiltração leucocitária intersticial e vasoconstrição glomerular. Dependendo da dose e tempo de terapia, os mecanismos

da lesão renal aguda (LRA) podem determinar a evolução para doença renal crônica, com perda do enxerto⁽⁷⁾.

A lesão renal aguda é uma síndrome caracterizada pelo rápido declínio da função renal, definida por um aumento absoluto da creatinina sérica de, pelo menos, 0,3mg/dl, elevação de 50% (1,5 vezes) do valor basal ou redução do fluxo urinário, documentado como oligúria ou fluxo de 0,5ml/kg por hora por mais de seis horas⁽⁸⁾. A LRA intrínseca, que compreende as lesões de origem nefrotóxica, é a segunda modalidade mais comum. A mortalidade pela LRA é alarmante, mantendo-se em 50%, apesar de inúmeras iniciativas clínicas⁽⁹⁾.

A nefrotoxicidade é efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro na clínica. Nessa lista, destacam-se antibióticos, anti-inflamatórios, antineoplásicos, medicamentos imunossupressores e contrastes radiológicos.

Os medicamentos imunossupressores têm reservado um capítulo à parte no estudo da nefrotoxicidade em decorrência do incremento no número de transplantes. Este estudo dará ênfase à investigação de agentes medicamentos, em especial, os fitomedicamentos, que possam atenuar a nefrotoxicidade do Tacrolimus.

No caso do FK 506, a LRA está associada à diminuição do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular, possivelmente ocasionado pela vasoconstrição das arteríolas glomerulares e a contração das células mesangiais em resposta aos distúrbios de oxidação já mencionados⁽¹⁰⁾. O aumento da secreção de endotelina, bem como da ativação do sistema renina-angiotensina, fazem crer que o decréscimo do coeficiente de ultrafiltração glomerular (K_p) possa ser um fator participante da nefrotoxicidade induzida por este imunossupressor⁽¹⁰⁾.

Muitos estudos têm se voltado para a identificação de agentes renoprotetores que têm como finalidade atenuar a nefrotoxicidade de fármacos não substituíveis. Contudo, por vezes, o próprio medicamento de proteção revela-se tóxico, valorizando o uso de agentes com menor potencial para efeitos indesejáveis, como os fitomedicamentos.

A fitomedicina, que consiste em terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, tem se tornado cada vez mais popular. A aplicação dos fitomedicamentos na rotina terapêutica em diferentes situações clínicas poderá representar alternativa viável e significativa, particularmente, em território nacional, cuja flora é tão diversificada e abundante.

O extrato seco de *Vitis vinifera L* é um fitomedicamento que contém proantocianidinas oligoméricas, espécies de flavonoides. Esses elementos têm a capacidade de neutralizar radicais livres de ferro e oxigênio, sendo de 15 a 20 vezes mais potentes que a vitamina E⁽¹¹⁾. Outros estudos apontam sua eficácia na LRA isquêmica e como anti-hipertensivo, agindo na inibição da enzima conversora de angiotensina, como redutor dos níveis de LDL (colesterol ruim) e aumento

do HDL (colesterol bom), por meio do aumento reverso de colesterol. Não há relatos de efeitos colaterais, tampouco toxicidade, relacionados à *Vitis vinifera* L.⁽¹²⁻¹⁴⁾.

A tentativa de atenuar a nefrotoxicidade do Tacrolimus com medicamentos que exibem outras toxicidades pode estabelecer relação de sinergismo e incorrer em maior número de efeitos indesejáveis. O uso de fitomedicamentos representa uma alternativa com menor risco de toxicidade diversa e pode contribuir para o aumento da vida do enxerto.

A ausência de dados concretos sobre nefrotoxicidade do Tacrolimus e a inoperância de manobras alopáticas na redução desse efeito colateral reforçam a importância de estudos que busquem elucidar essas restrições na clínica.

Considerando a ampla utilização do Tacrolimus nas terapias imunossupressoras e ressaltando que seu potencial nefrotóxico pode levar à perda do enxerto, este estudo visou verificar o efeito renoprotetor do extrato de *Vitis vinifera* L na nefrotoxicidade induzida pelo Tacrolimus em estudos experimentais com ratos.

O conhecimento a respeito dos efeitos desejáveis e indesejáveis dos medicamentos pelo enfermeiro, com os quais se pauta sua prática rotineira, é mecanismo básico de sustentação do exercício profissional e justifica a inserção desse profissional em estudos de experimentação com animais, à semelhança de sua participação já consagrada na pesquisa clínica.

MÉTODOS

Os procedimentos necessários para a realização deste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biológicas IV da Universidade de São Paulo, sob o Protocolo n.º75/2009.

Trata-se de pesquisa quantitativa com modelo experimental, na qual foram incluídos ratos wistar, machos, adultos, pesando entre 250g e 300g. Os animais foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e só foram utilizados os considerados inteiramente saudáveis pelos critérios biológicos daquela instituição. Os ratos foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo Controle: quatro animais que receberam somente solução de cloreto de sódio, 0,1 ml, por gavagem, durante cinco dias, uma vez ao dia.

Grupo FK: sete animais que receberam Tacrolimus, 0,5 mg/kg, por gavagem, durante cinco dias, uma vez ao dia.

Grupo Vitis: sete animais que receberam *Vitis vinifera* L, 3,0 mg/kg, por gavagem, cinco dias, uma vez ao dia.

Grupo FK + Vitis: sete animais que receberam Tacrolimus (0,5 mg/kg, por gavagem, cinco dias, uma vez ao dia) e *Vitis Vinifera* L (3,0mg/kg, por gavagem, cinco dias, uma vez ao dia).

Ao final dos tratamentos, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para obtenção da urina 24h e posterior mensuração da creatinina e peróxidos urinários que foram utilizados, como marcadores de função renal e índice oxidativo.

Após a obtenção da urina, os ratos foram anestesiados com tiopental sódico e submetidos à laparotomia para coleta de sangue, por meio da punção em aorta abdominal, para posterior dosagem de creatinina sérica.

Ao término do experimento, os animais foram sacrificados segundo as normas éticas para manuseio de animais em laboratório.

Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração durante todo o experimento e permaneceram em condições térmicas adequadas e ciclos alternados entre dia e noite.

A mensuração de creatinina plasmática e urinária foi realizada pelo método de Jaffe⁽¹⁵⁾.

A função renal dos animais foi analisada por meio do clearance de creatinina, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária(mg/dl)} \times \text{fluxo urinário (ml/min)}}{\text{creatinina plasmática (mg/dl)}}$$

Os peróxidos são considerados como potenciais indicadores da formação ou resultantes de espécies reativas de oxigênio. A mensuração direta de peróxidos pode ser realizada pelo método de FOX-2, que consiste na utilização de ferro-xilenol laranja para determinação dos níveis de peróxidos.

Os peróxidos, quando diluídos em solução ácida, oxidam o íon Fe^{2+} para íon Fe^{3+} , como demonstrado na reação abaixo:



O xilenol laranja [ácido (o-cresolsulfonaftalina 3', 3''- bis (metilamino) ácido diacético] apresenta alta seletividade para o íon Fe^{3+} , produzindo um complexo de coloração azul-arroxeadado ($\alpha = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽¹⁶⁾.

A solução FOX-2 foi preparada utilizando-se, ordenadamente, os seguintes reagentes:

90 ml de metanol

10 ml de água destilada

100 μM xilenol laranja

4 mM BHT (2[6] – di-tert-butil-p-cresol)

25mM da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4)

250 μM de sulfato ferroso de amônio – (Vetec Química – RJ, Brasil)

Na etapa seguinte, acrescentou-se a 900 μl desta solução, 100 μl da amostra de urina. Após homogenização a solução permaneceu em repouso em temperatura

ambiente por 30 minutos. A solução foi centrifugada para retirada de resíduos e mantida em gelo por, aproximadamente, 10 minutos. A leitura foi realizada por espectrofotometria em absorbância de 560 nm.

Os valores foram estabilizados por grama de creatinina urinária e expressos por nmol de peróxidos / grama creatinina⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

A análise dos dados foi realizada pelo método ANOVA. Quando o nível da significância foi <0,05, considerou-se que o efeito de, pelo menos, um dos grupos era diferente dos outros. Os testes múltiplos de comparação 2 a 2 de Bonferroni foram utilizados para avaliar quais grupos diferiam ou não entre si.

O estudo foi desenvolvido no período de agosto de 2008 a outubro de 2010 no Laboratório de Pesquisa Experimental com Modelos Animais da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

RESULTADOS

Conforme demonstrado nos dados da Tabela 1, os grupos Salina e *Vitis*, utilizados como controle para este estudo, não demonstraram variabilidade significativa quanto à função renal e confirmaram-se como controles para os demais.

A administração de FK resultou em redução significativa do clearance de creatinina quando comparado ao grupo controle ($0,13 \pm 0,01$ vs $0,74 \pm 0,01$). Esse achado reiterou a ocorrência de LRA nefrotóxica ($p < 0,001$).

Quanto à excreção de peróxidos urinários, utilizada neste estudo como marcador indireto da produção de radicais livres de oxigênio, observou-se uma elevação desse parâmetro, comparando-se os grupos Salina e FK ($0,6 \pm 0,02$ vs $4,2 \pm 0,26$).

Em contrapartida, os animais que foram submetidos ao tratamento simultâneo com FK e *Vitis vinifera L*, apresentaram função renal significativamente melhor que os animais que receberam apenas FK ($0,28 \pm 0,01$ vs $0,13 \pm 0,01$). Esse dado sublinhou que o efeito antioxidante interferiu beneficemente na nefrotoxicidade do FK. Esses achados confirmaram a renoproteção da *Vitis Vinifera L* nesse modelo de toxicidade ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

O número de transplantes renais vem aumentando anualmente; de janeiro a março de 2010 foram realizados 1.160 transplantes renais. Comparando-se ao ano anterior, houve um acréscimo de 8,4% nesse tipo de transplante⁽¹⁹⁾. Para a manutenção do enxerto, drogas imunossupressoras são necessárias, sendo o Tacrolimus uma delas.

Um dos efeitos indesejáveis do Tacrolimus é a nefrotoxicidade⁽²⁰⁾. Acredita-se que um dos mecanismos associados à lesão renal provocada pelo FK506 seja a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)⁽²¹⁾.

Neste contexto, a realização de estudos com fitomedicamentos, como a *Vitis Vinifera L*, objetivando a prevenção ou redução dos danos causados pelo FK506, pode ser promissora, tendo em vista que a utilização dos inibidores de calcineurina é, até o momento, indispensável na terapia imunossupressora.

Os flavonoides do vinho vêm se destacando por sua ação antioxidante por meio do sequestro de radicais livres por modularem atividades enzimáticas em prol da inibição da peroxidação lipídica⁽²²⁻²³⁾.

Neste estudo, comprovou-se que a utilização de FK506 aumentou significativamente a produção de peróxidos urinários, o que sugere, indiretamente, um aumento da produção de EROs. Acompanhado a esse parâmetro, observou-se o declínio do clearance de creatinina. A administração concomitante de FK506 e *Vitis Vinifera L* promoveu redução significativa dos níveis de peróxidos urinários e melhorou a função renal, observada pelo aumento do clearance de creatinina. Outro estudo demonstrou a ação pró-oxidante dos inibidores de calcineurina por meio da peroxidação lipídica e confirmou o efeito renoprotetor da utilização das vitaminas A e C, ambos antioxidantes⁽²⁴⁾.

O efeito renoprotetor proporcionado pela *Vitis vinifera L* pode estar relacionado ao sequestro de radicais livres, à inibição da peroxidação lipídica, ou ainda, à atuação nessas duas vias. É fato que o efeito antioxidante do vinho tem sido ressaltado em razão de suas implicações benéficas no controle da inflamação endotelial e melhoria das condições de perfusão

Tabela 1- Parâmetros globais da função renal e da excreção de peróxidos urinários em ratos dos grupos estudados – São Paulo, 08/2008 a 10/2010.

Grupos	Peso (g)	Fluxo urinário (ml/min)	Clcr/100g (ml/min)	Peróxidos urinários (nmol/g de creatinina)
Salina (n=4)	256+3	0,008+0,0002	0,74+0,01	0,6+0,02
Vitis (n=7)	262±4	0,011±0,0002	0,76±0,02	0,6±0,01
Fk (n=7)	271±5	0,011±0,0004	0,13±0,01 ^a	4,2±0,26 ^a
Fk+Vitis (n=7)	277+4	0,011+0,0004	0,28+0,01 ^b	2,6+0,19 ^b

^a $p < 0,001$ vs Salina, $bp < 0,001$ vs Fk
Resultados expressos como média ± erro-padrão

miocárdica. O resultado satisfatório na homeostase miocárdica estimulou a investigação de seus efeitos em outros órgãos, em situações de lesão semelhante àquelas citadas para a isquemia miocárdica: a inflamação e o desequilíbrio redox. A LRA compõe esse cenário e mostrou ser reativa ao tratamento com esse fitomedicamento.

Em síntese, os resultados apresentados neste estudo realçam o efeito protetor da *Vitis vinifera* L na função renal de ratos submetidos ao tratamento com Tacrolimus. A redução de peróxidos urinários confirmou o efeito antioxidante deste medicamento. Certamente, outros estudos que detalhem o perfil oxidativo e os mecanismos intracelulares da LRA nefrotóxica ocasionados pelo Tacrolimus e seu tratamento com *Vitis vinifera* L trarão mais clareza aos dados aqui apresentados.

As atividades de pesquisa que visem à melhoria da saúde e que respeitem os princípios éticos em homens e

animais são direitos de todos os pesquisadores da saúde e devem estar presentes também no cotidiano do enfermeiro.

CONCLUSÃO

Os dados confirmaram a lesão nefrotóxica induzida pelo Tacrolimus com a redução da função renal evidenciada pelo clearance de creatinina.

A *Vitis vinifera* L demonstrou efeito renoprotetor significativo com dados de clearance superiores ao do Tacrolimus.

A administração de Fk 506 elevou a excreção de peróxidos urinários, e a administração simultânea com *Vitis vinifera* L reduziu tais parâmetros, o que demonstra o efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L e sugere o mecanismo oxidativo, como sendo um dos ramos da lesão renal aguda nefrotóxica induzida pelo Tacrolimus.

REFERÊNCIAS

1. First MR. Tacrolimus based immunosuppression. J Nephrol. 2004;17 Suppl 8:S25-31.
2. Associação Brasileira de transplante de órgãos. Reg Bras Transpl. [Internet]. 2009; 15(4): 3. [citado 2010 Jul 26]. Disponível em: http://abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXV_n4/index.aspx?idCategoria=2
3. Moudgil A. Renal transplantation. Indian J Pediatr. 2003;70(3):257-64. Review.
4. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Saúde. Lista de espera para transplante, com doador cadavérico, no Estado de São Paulo. Secretaria da saúde do Estado de São Paulo; 2010. [citado 2010 Jul 26]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/content/gestor_infomacoes_saude_transplantes_lista_espera.mmp
5. Ardenghi J, Ceresér KMM. Tacrolimus na imunossupressão em transplantes hepáticos. RBM Rev Bras Med. 2000;57(6):566:570:573-568-571-574.
6. Han SY, Mun KC, Choi HJ, Kawak CS, Bae JH, Suh SI, et al. Effects of cyclosporine and tacrolimus on the oxidative stress in cultured mesangial cells. Transplant Proc. 2006;38(7):2240-1.
7. Ninova D, Covarrubias M, Rea DJ, Park WD, Grande JP, Stegall MD. Acute nephrotoxicity of tacrolimus and sirolimus in renal isografts: differential intragraft expression of transforming growth factor-beta1 and alpha-smooth muscle actin. Transplantation. 2004;78(3):338-44
8. Metha RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A; Acute Kidney Injury Network. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care. 2007;11(2):R31.
9. Cuvello Neto AL, Costa MC, Burdmann EA, Yu L. Atualização em insuficiência renal aguda: nefrotoxicidade aguda de drogas imunossupressoras. J Bras Nefrol. 2000;22(2):114-20.
10. Oliveira VCR, Tejos CR, Hosaka EM, Andrade SC, Araújo M, Vattimo MFF. Interferência do intervalo de administração da droga sobre a nefrotoxicidade da gentamicina em ratos. Rev Esc Enferm USP. 2001;35(2):200-4.
11. Maffei Facino R, Carinin M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*. A mechanism for their capillary protective action. Arzneimittelforschung. 1994;44(5):592-601.
12. Bombardelli E, Morazzoni P. *Vitis vinifera* L. Fitoterapia. 1995;66(4):291-317.
13. Martim ECO, Pinto CF, Watanabe M, Vattimo MFF. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L. Rev Bras Ter Intensiva. 2007;19(3):292-6.
14. Bezerra JS, Teixeira W, Vattimo MFF. Efeito protetor da *Vitis Vinifera* na lesão renal aguda isquêmica em ratos. J Bras Nefrol. 2008;30(2):99-104.
15. Dórea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM, et al. Nephrotoxicity in amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. J Am Soc Nephrol. 1997;8(9):1415-22.
16. Wolff SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for mensurament of hydroperoxides. Methods Enzymol. 1994;233:182-9.
17. Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. Clin Chim Acta. 2003;334(1-2):205-9.
18. Halliwell B, Long LH, Yee TP, Lim S, Kelly R. Establishing biomarkers of oxidative stress: the measurement of hydrogen peroxide in human urine. Curr Med Chem. 2004;11(9):1085-92.
19. Associação Brasileira de transplante de órgãos. Reg Bras Transpl. [Internet]. 2010;16(1):3 [citado 2010 Jun 30]. Disponível em: http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXVI_n1/index.aspx?idCategoria=2
20. de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. Am J Kidney Dis. 2000;35(2):333-46.
21. Han SY, Mun KC, Choi HJ, Kwak CS, Bae JH, Suh SI, et al. Effects of cyclosporine and tacrolimus on the oxidative stress in cultured mesangial cells. Transplant Proc. 2006;38(7):2240-1.
22. Solomon S. Developmental changes in nephron number, proximal tubular length and superficial nephron glomerular filtration rate of rats. J Physiol. 1977;272(3):573-89
23. Puiggros F, Llopiz N, Ardévol A, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. J Agric Food Chem. 2005;53(15):6080-6.
24. Varghese Z, Fernando RL, Turakhia G, Psimenou E, Fernando ON, Sweny P, et al. Calcineurin inhibitors enhance low-density lipoprotein oxidation in transplant patients. Kidney Int Suppl. 1999;71:S137-40.